

**HyperScript™ III 1st Strand cDNA
Synthesis Kit**

货号: R101

保存条件: -20 °C长期储存

产品介绍:

本品为以RNA为模板合成1st Strand cDNA的试剂盒。通过使用不同的逆转录引物本试剂盒既可以合成全长cDNA用于克隆,又可以合成高度均一的cDNA用于qPCR定量。试剂盒所使用的逆转录酶是基于M-MLV定向进化而来的新一代逆转录酶,具有更低的RNase H活性、更高的热稳定性和cDNA合成效率,搭配为其优化的最适buffer,可以获得15k以上的全长cDNA。

产品组成:

组分	R101-01 (50个反应)	R101-02 (100个反应)
5 × RT Mix	200 μL	400 μL
HyperScript™ III Enzyme Mix	100 μL	200 μL
Oligo (dT) ₂₀ VN	50 μL	100 μL
Random Primers	50 μL	100 μL
RNase-free ddH ₂ O	1.5 mL	1.5 mL

温馨提示:

- 5x RT Mix 若出现白色沉淀,请颠倒混匀确保沉淀完全溶解后使用。
- 为保证实验成功率和准确性,请勿使用过度降解的RNA。
- 配置反应液时,请使用RNase-free枪头、Microtube等。
- 若后续为定量PCR(qPCR),逆转录15 min;若后续为克隆实验,逆转录45 min。

产品使用:**1.配置逆转录反应体系**

请配置如下反应液:

	真核生物mRNA 后续为克隆全长	真核生物mRNA 后续为qPCR	原核生物RNA	使用基因 特异性引物
Total RNA	1ng - 5 μg	1ng - 5 μg	1ng - 5 μg	1ng - 5 μg
5 × RT Mix	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
HyperScript™ III Enzyme Mix	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
Oligo (dT) ₂₀ VN*	1 μL	1 μL	/	/
Random Primers*	/	1 μL	1 μL	/
Gene Specific Primers*	/	/	/	2 pmol(1 μM, 2 μL)
RNase-free ddH ₂ O	补足至20 μL	补足至20 μL	补足至20 μL	补足至20 μL

注: 1. 后续实验为克隆实验,若RNA来源于真核生物,只需使用Oligo (dT)₂₀ VN即可,加入Random Primers会降低全长cDNA的产量;

若RNA来源于原核生物,只需使用Random Primers 或基因特异性引物(2pmol)。

2. 后续实验为qPCR,请同时加入Oligo(dT)₂₀ VN和Random Primers以获得在mRNA不同位置逆转录效率均一的cDNA。

3. 如果使用纯化后的mRNA,加入的量10 pg - 500 ng。

2. 逆转录反应程序

请按如下条件进行逆转录反应：

25°C*	5 min
37°C*(高GC模板请使用50°C)	45min (克隆实验) 或者 15min for qPCR
85°C	5 sec

注：1. 25°C 5min有助于Random Primers与RNA结合，若不使用Random Primers该步骤可省略。

2. 若后续实验为克隆实验，逆转录45min即可产生大量的全长cDNA；若后续实验为qPCR，逆转录15min即可。

3. HyperScript™ III 在37-60°C均有较强活性，37°C即可满足绝大多数实验；若目标RNA区域有高GC部分，可提高逆转录温度至50°C。

4. 85°C 5s 可以失活逆转录酶和gDNA remover，请勿省略该步骤。

逆转录产物可直接用于下游实验，也可置于4°C短暂放置，3-6个月内-20°C保存，长期存放请置于-80°C冰箱，cDNA小份分装避免反复冻融。

常见问题及解决方案：

问题	解决方案
cDNA产量低	可以通过琼脂糖电泳检测RNA完整度，严重降解的RNA不适合获得完整的cDNA。 RNA投入量严重不足，请确保RNA定量准确。 逆转录引物使用不当。
逆转录引物如何选择	根据不同的实验目的进行选择。下面列举几种常见应用场景： 1. 克隆全长的真核生物mRNA用于后续实验，选择只用Oligo(dT) ₂₀ VN。 2. 克隆真核生物mRNA的部分序列或真核生物的其他RNA，选择Random Primers或二者同时使用。 3. 克隆原核生物的RNA，选择使用Random Primers。 4. 使用qPCR定量目的RNA，选择同时使Oligo(dT) ₂₀ VN和Random Primers。